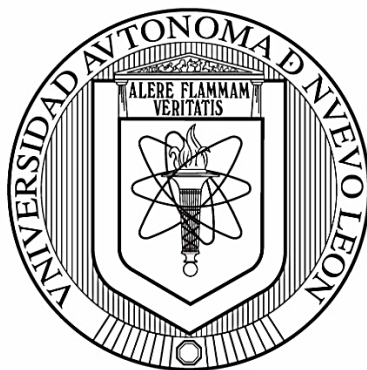


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EFFECTO FUNCIONAL DEL miR-660 EN LA PROLIFERACIÓN DEL
CÁNCER MAMARIO RECEPTOR ESTRÓGENO POSITIVO Y RECEPTOR
ESTRÓGENO NEGATIVO.**

POR

IRMA ESTEFANÍA ANCIRA MORENO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA
EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA.**

JUNIO, 2021

**EN LA PROLIFERACIÓN DEL CÁNCER MAMARIO
RECEPTOR DE ESTRÓGENO POSITIVO Y
RECEPTOR DE ESTRÓGENO NEGATIVO**


Comité de tesis



Dra. Vianey González Villasana
Presidente



Dra. Diana Reséndez Pérez
Secretario



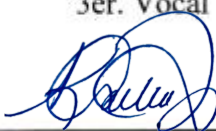
Dra. Cristina Rodríguez Padilla
1er. Vocal



Dr. Fermín Mar Aguilar
2do. Vocal



Dra. Claudia Dalila Altamirano Torres
3er. Vocal



Dra. Katiushka Arévalo Niño
Subdirectora de Posgrado



**EFFECTO FUNCIONAL DEL MIR-660
EN LA PROLIFERACIÓN DEL CÁNCER MAMARIO
RECEPTOR DE ESTRÓGENO POSITIVO
Y RECEPTOR DE ESTRÓGENO NEGATIVO**

DIRECCIÓN DE TESIS

Vianey González V.

Dra. Vianey González Villasana

Directora

DERECHOS RESERVADOS©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.



El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Inmunología y Virología, Unidad de Biología del Desarrollo de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico durante mi estancia en el programa de la maestría en ciencias con orientación en inmunobiología.

Agradezco también al proyecto CONACYT “Efecto funcional del miR-660 en la proliferación e invasión del cáncer de mama recetor de estrógeno positivo y receptor de estrógeno negativo” con No de solicitud. SA 1243-20 por el financiamiento del presente trabajo de investigación.

Gracias a mi asesora la Dra. Vianey González Villasana por confiar en mi para desarrollar la primera parte de este proyecto.

Gracias infinitas a mis compañeros de proyecto M.C. Valeria Villareal y M.C. Roberto Estupiñán. A la M.C. Carolina Bonilla y a la Dra. Margarita Ortiz Martínez por todos sus consejos en mi camino antes y durante el posgrado.

También agradezco a mi comité de tesis, Dra. Diana Reséndez Pérez, Dra. Claudia Dalila Altamirano y Dr. Fermín Mar Aguilar por su guía y valiosos consejos en seminarios. Al PhD. Recep Bayraktar por su apoyo en todo momento.

Finalmente, gracias a la Dra. Cristina Rodríguez Padilla y a la Dra. Diana Reséndez Pérez por brindarme la oportunidad de desarrollar mi trabajo en las instalaciones del Laboratorio de Inmunología y Virología, Unidad de Biología del Desarrollo de la Facultad de Ciencias Biológicas.

ÍNDICE

LUGAR DE TRABAJO	5
AGRADECIMIENTOS.....	6
ÍNDICE.....	7
ÍNDICE DE TABLAS.....	9
ÍNDICE DE FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
RESUMEN	13
ABSTRACT.....	14
1. INTRODUCCIÓN	15
2.ANTECEDENTES.....	17
2.1 MiRNAs y su biogénesis	17
2.2 Cáncer y proliferación	19
2.3 Cáncer de mama.....	21
2.3.1 Clasificación histológica del cáncer de mama	21
2.3.2 Clasificación TNM del cáncer de mama	22
2.3.3 Clasificación molecular del cáncer de mama	23
2.3.4 Tratamiento.....	24
2.4 MiRNAs y cáncer de mama.....	24
2.5 MiRNAs como blanco terapéutico.....	26
3. JUSTIFICACIÓN	29
4. HIPÓTESIS	30
5. OBJETIVO GENERAL	31
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
7. MATERIAL Y MÉTODOS	32
7.1 Estrategia experimental	32
7.2 Líneas celulares.....	32
7.3 Extracción de RNA de las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 (RE+) y MDA-MB-231 (RE-) y la línea control MCF-10A.....	33
7.4 Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (qRT-PCR).....	33
7.5 Transfección de las líneas celulares de cáncer de mama en placa de 96 pozos.....	35
7.6 Validación de la transfección.....	35

7.7 Ensayo de proliferación.....	36
7.8 Análisis Estadísticos.....	37
8. RESULTADOS	38
8.1 Cuantificación de miRNAs.....	38
8.2 Determinación de los niveles basales del miR-660 en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 (RE+) y MDA-MB-231 (RE-).....	39
8.3 Eficiencia de la transfección en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 (RE-).....	40
8.4 Determinación del efecto del miR-660 en la proliferación de líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 (RE+) y MDA-MB-231 (RE-)	
8.4.1 línea celular MCF-7 (RE+).....	42
8.4.2 línea celular MDA-MB-231 (RE-)	44
9. DISCUSIÓN	45
10. CONCLUSIÓN	49
11. PERSPECTIVAS	50
12. BIBLIOGRAFÍA.....	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Mezcla de reacción para primer paso de síntesis de cDNA.....	33
Tabla 2.	Mezcla de reacción para segundo paso de síntesis de cDNA.....	33
Tabla 3.	Mezcla de reacción para análisis qRT-PCR.....	34
Tabla 4.	Concentración de RNAs pequeños en las líneas celulares de interés.....	38
Tabla 5.	Ciclos de amplificación en las líneas celulares de interés.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Biogénesis y procesamiento de los miRNAs.....	18
Figura 2. Proliferación del cáncer	20
Figura 3. Participación de los miRNAs en la progresión del cáncer de mama.....	26
Figura 4. Expresión del miR-660 en muestras de tejido tumoral y normal mamario....	27
Figura 5. Esquema de la placa de 96 pozos para el ensayo de MTS.....	36
Figura 6. Niveles basales del miR-660 en las líneas de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 y las células control MCF-10A.....	39
Figura 7. Niveles de expresión del miR-660 en la línea celular MDA-MB-231 a las 48 h de incubación.....	40
Figura 8. Niveles de expresión del miR-660 en la línea celular MDA-MB-231 48 horas después de la transfección con el inhibidor de dicho miRNA.....	41
Figura 9 Efecto del miR-660 sobre la proliferación de la línea celular MCF-7 (RE+).....	42
Figura 10. Efecto del miR-660 sobre la proliferación de la línea celular MDA-MB-231 (RE-).....	44

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

AKT Proteína quinasa B (o PKB)

CaMa Cáncer de mama

CDKN1A Inhibidor de quinasa 1A dependiente de ciclina

CDKN1B Inhibidor de quinasa 1B dependiente de ciclina

CDK8 Quinasa dependiente de ciclina 8

FOXO1 Proteína Forkhead box O1

HER2 Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2

MCL-1 Proteína de diferenciación celular de leucemia mieloide inducida

MDM2 Proteína murina double minute 2

mTor Diana de rapamicina en células de mamífero

MTS 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro

PI3K Fosfoinositol-3-quinasa

RE+ Receptor estrógeno positivo

RE- Receptor estrógeno negativo

SOCS1 supresor de señalización de citocinas 1

STAT5A Transductor de señal y activador de la transcripción 5A

TCGA The Cancer Genome Atlas

TET2 Metilcitosina desoxigenasa 2

TFCP2 Factor de transcripción CP2

RESUMEN

Los miRNAs son moléculas de RNA pequeñas y no codificantes que actúan inhibiendo la traducción del mRNA blanco a proteína. En cáncer la desregulación en la expresión de los miRNAs permite que puedan actuar como oncogenes o supresores tumorales, relacionándose de esta manera con la progresión del cáncer. Empleando la base de datos del TCGA (The Cancer Genome Atlas), realizamos un análisis de la expresión de miRNAs en cáncer de mama a partir del cual, identificamos que el miR-660 se encuentra significativamente sobreexpresado y asociado a una baja supervivencia en pacientes con cáncer mamario. Hasta el momento, se ha reportado que el miR-660 induce proliferación en células de cáncer de mama MCF-7 (RE+) a través de la vía miR-660/TFCP2/CDKN1A y la vía TET2/ PI3K/AKT/mTOR en células MCF-7 (RE+) y MDA-MB-231 (RE-). Debido a que un solo miRNA es capaz de regular múltiples blancos y participar en diversas vías, en la presente investigación que constituye la primera parte de un proyecto más amplio, nos propusimos determinar el papel que el miR-660 juega en la proliferación del cáncer de mama RE+ y RE-. Nuestros resultados muestran una sobreexpresión significativa del miR-660 en las líneas celulares MCF-7 (RE+) (***, $p=0.0002$) y MDA-MB-231 (RE-) (***, $p=0.0005$) comparado con la expresión en las células control (MCF-10A). Además, indican que esta sobreexpresión induce la proliferación en las células de ambos subtipos moleculares.

ABTRACT

MiRNAs are small non-coding RNA molecules that act by inhibiting protein translation of their target mRNA. In cancer miRNA dysregulation allows them to act as oncogenes or tumor suppressors, participating in cancer progression. Using the TCGA (The Cancer Genome Atlas) database, we performed a miRNA expression analysis in breast cancer from which we identified that miR-660 is significantly overexpressed and associated with low survival in breast cancer patients. Until now, miR-660 has been reported to induce proliferation in breast cancer cell line MCF-7 (RE +) through the miR-660/TFCP2/CDKN1A pathway and the TET2/PI3K/AKT/mTOR pathway in both MCF-7 (RE +) and MDA-MB-231 (RE-) cells. Since a single miRNA is able to regulate multiple targets and signaling pathways, therefore, in the present investigation, which constitutes the first part of a larger project, we seek to determine the role that miR-660 plays in the proliferation of RE + and RE- breast cancer. Our results show a significant overexpression of miR-660 in MCF-7 (RE +) (***, $p = 0.0002$) and MDA-MB-231 (RE-) (***, $p = 0.0005$) cell lines compared to the expression in control cells (MCF-10A). Furthermore, indicate that this overexpression induces proliferation in cells of both molecular subtypes.

1. INTRODUCCIÓN

Los miRNAs son pequeñas moléculas de RNA no codificantes, de aproximadamente 22 nt de largo, participan en la regulación de la expresión génica a nivel post-transcripcional, al inhibir la traducción o inducir la degradación de su mRNA blanco (Espinoza y Wang, 2012).

Los miRNAs son capaces de regular diversos procesos biológicos y procesos de carcinogénesis. En cáncer la expresión de los miRNAs se encuentra desregulada, por lo que pueden comportarse como oncogenes o supresores tumorales, afectando de esta manera uno o varios de los procesos esenciales para la progresión del cáncer. Además, cambios en la expresión de los miRNAs pueden ser indicadores de la prognosis de esta enfermedad (Mehrgou et al., 2018).

Por lo anterior, el estudio de los miRNAs ha sido de gran interés para la identificación de nuevos blancos y estrategias terapéuticas en varios tipos de cáncer entre los que se encuentra el de mama, el cual, continúa siendo el más común entre la población femenina a nivel mundial (WHO, 2019). De acuerdo con estadísticas mundiales en el 2020 se reportaron 2,261,419 millones de nuevos casos de cáncer mamario (GLOBOCAN, 2020). Mientras que en México en ese mismo año se detectaron 29,929 (GLOBOCAN, 2020). El cáncer de mama es la proliferación maligna de las células epiteliales que recubren los conductos o lobulillos mamarios (INCAN, 2016). Debido a que las células cancerígenas de la mama pueden o no expresar ciertos genes, el cáncer de mama se clasifica molecularmente en diferentes subtipos. Luminal A (receptores hormonales positivos, HER2 negativo, bajo ki-67), Luminal B (receptores hormonales positivos, HER2 negativo, alto ki-67), HER2 (positivo para HER2 sin importar el estatus de los receptores hormonales) y basal like (receptores hormonales negativos, HER2 negativo) (Koh y Kim, 2018). Esta clasificación, en conjunto con el estadio del cáncer, permite establecer el tratamiento adecuado para cada paciente.

Identificar miRNAs asociados a un mal pronóstico o baja supervivencia y determinar su función, nos permitirá conocer mejor los mecanismos a través de los cuales, los miRNAs favorecen la progresión del cáncer mamario. Mediante el uso de la base de datos del

TCGA (The Cancer Genome Atlas) y en colaboración con el MD Anderson Cancer Center, llevamos a cabo un análisis de expresión de miRNAs en cáncer de mamario a partir del cual, identificamos que el miR-660 se encuentra significativamente sobreexpresado en muestras de tejido tumoral, comparado con muestras de tejido normal de mama y que esta sobreexpresión se asocia a una baja supervivencia en pacientes con cáncer mamario.

Hasta el momento, en cáncer de mama se ha reportado que el miR-660 induce proliferación, migración e invasión en células de cáncer de mama MCF-7 (RE+), lo anterior a través de la vía implicada en inducción de arresto celular, proliferación e inhibición de la migración TFCP2/CDKN1A (Shen et. al, 2017). Sin embargo, la metodología propuesta no permite validar que es a través de dicha vía que el miR-660 induce estos procesos en las células MCF-7.

En un estudio más reciente se reporta al miR-660 como promotor de proliferación, migración e invasión en las células MCF-7 (RE+) y MDA-MB-231 (RE-) mediante modulación de TET2 mediante la vía PI3K/AKT/mTOR (Peng et. al, 2020). Sin embargo, los miRNAs implicados en la progresión del cáncer usualmente se encuentran regulando múltiples blancos y vías de manera simultánea (Xu *et. al*, 2020).

En el presente trabajo determinamos los niveles basales del miR-660 y su actividad en la proliferación de las células de cáncer de mama MCF- 7 y MDA-MB-231. Nuestros resultados, muestran una sobreexpresión del miR-660 en las células de cáncer de mamario RE+ y RE- y sugieren que esta sobreexpresión promueve la proliferación en dichas células.

2. ANTECEDENTES

2.1 MiRNAs y su biogénesis

Los miRNAs son pequeñas moléculas de RNA no codificante, de un tamaño promedio de 22 nt de largo, participan regulando la expresión génica a nivel post-transcripcional, a través de inhibir la traducción o degradar el mRNA blanco. (Espinoza y Wang, 2012). Se estima que del 1 al 5 % del genoma humano se compone de miRNAs, estos a su vez son capaces de regular al menos el 30% de los genes codificadores de proteínas. Cada miRNA puede interactuar con un gran número de mRNA ya sea de forma directa o indirecta. De la misma manera, la expresión de un solo mRNA puede ser regulada en conjunto por varios miRNAs (Frontela, 2012).

La biogénesis de los miRNAs comienza con la formación de un transcrito primario (~70 nt) pri-miRNA, producido por la RNA polimerasa II (Pol II), este a su vez es procesado por el complejo Drosha/DGCR8 para generar un pre-miRNA que contiene dos nucleótidos que sobresalen en el extremo 5' terminal, esto les permite ser reconocidos por el complejo exportina-5/Ran-GTP para ser posteriormente exportados al citoplasma. Una vez localizado dentro del citoplasma, DICER (Dicer 1, Ribonucleasa de tipo III) se encarga de procesar la estructura en forma de asa del pre-miRNA, generando una molécula de doble cadena conocida como miRNA duplex que consiste en una cadena madura y su cadena complementaria que en algunos casos se degradará y en otros tendrá una función reguladora como miRNA maduro. El miRNA maduro es reconocido por el complejo de proteínas RISC (Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA), cuyos principales componentes son las proteínas Argonauta (Ago), este complejo selecciona la secuencia madura o guía. El reconocimiento del mRNA blanco, por el miRNA, ocurre por complementariedad entre la región semilla del miRNA (nt 2-8) y la región 3'UTR del mRNA blanco (Esparza Garrido y Velázquez Flores, 2016).

Si la complementariedad es imperfecta se reprime la traducción del mRNA. Si, por otro lado, la complementariedad es perfecta, se induce un corte preciso en los enlaces fosfodiéster de los nucleótidos de interés, este proceso es finalizado por acción de exonucleasas que degradan los fragmentos restantes (Figura 1) (Frontela, 2012).

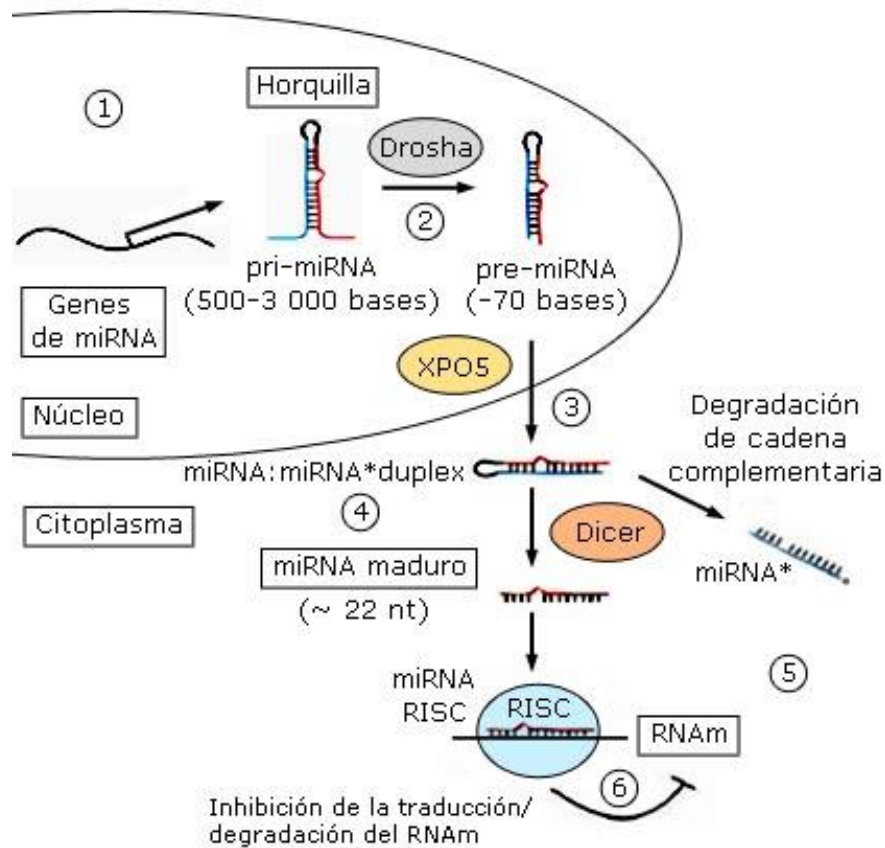


Figura 1. Biogénesis y procesamiento de los miRNAs. La RNA polimerasa II inicia la transcripción del pri-miRNA, en seguida se genera el pre-miRNA por el complejo microprocesador DROSHA/DGCR8. El pre-miRNA es exportado al citoplasma por EXP-5, en donde es procesado por DICER generando un miRNA duplex, que será reconocido por el complejo RISC, que seleccionará una de las dos cadenas dando lugar al miRNA maduro (Frontela, 2012).

Debido a la complementariedad imperfecta entre los miRNAs y sus blancos, cada miRNA puede poseer más de 100 blancos, lo que les permite actuar de manera coordinada en diversos procesos celulares y ser considerados como una de las clases más grandes de reguladores (Frontela, 2012). Por ello, su desregulación está implicada en diversas enfermedades, entre ellas, el cáncer.

2.2 Cáncer y proliferación

El cáncer se define como crecimiento de un tejido específico provocado por la acción de la proliferación continua y descontrolada de células anormales que adquirieron la

capacidad de diseminarse a otros tejidos. Esto puede suceder en cualquier célula de cualquier tejido, por lo que se ha demostrado que no es una sola enfermedad, sino un conjunto de enfermedades que se clasifican dependiendo de la célula y tejido del cual se origine. (Aibar et. Al., 2010). En 2011 Hanahan y Weinberg proponen agrupar, bajo el término de marcas distintivas del cáncer las características de las células tumorales que dan lugar a la progresión del cáncer, tomando en cuenta también las interacciones con el microambiente tumoral, estas incluyen señales proliferativas constitutivas, potencial replicativo sostenido, inhibición de señales antiproliferativas, resistencia a la apoptosis, inducción de angiogénesis, evasión al sistema inmune, inflamación y capacidad metastásica (Hanahan y Weinberg, 2011)

La proliferación es un proceso mediado por la síntesis y liberación de señales promotoras del crecimiento que dirigen cada uno de los pasos del ciclo de división celular, asegurando así el funcionamiento normal de la célula. En cáncer estas señales se encuentran desregularizadas (Figura 2). Durante la carcinogénesis las células pierden la capacidad de proliferar adecuadamente a pesar de las señales que regulan la activación del ciclo celular. En general, las proteínas que favorecen la proliferación se conocen como oncoproteínas, codificadas por proto-oncogenes. Diferentes tipos de mutaciones conducen a la transcripción y traducción de oncoproteínas con actividad constitutiva, independiente de ligando. Los receptores de los diferentes factores crecimiento y las moléculas de transducción de señal hacia el núcleo celular actúan como oncoproteínas. En contraste, los genes supresores de tumor producen proteínas que al inhibirse favorecen la progresión del cáncer. La desregulación en la expresión de estas moléculas conlleva a una desorganización en los puntos de control del ciclo celular, de las vías señalización de retroalimentación negativa y de los mecanismos encargados de reparar el DNA induciendo así la proliferación celular (Hanahan y Weinberg, 2011).

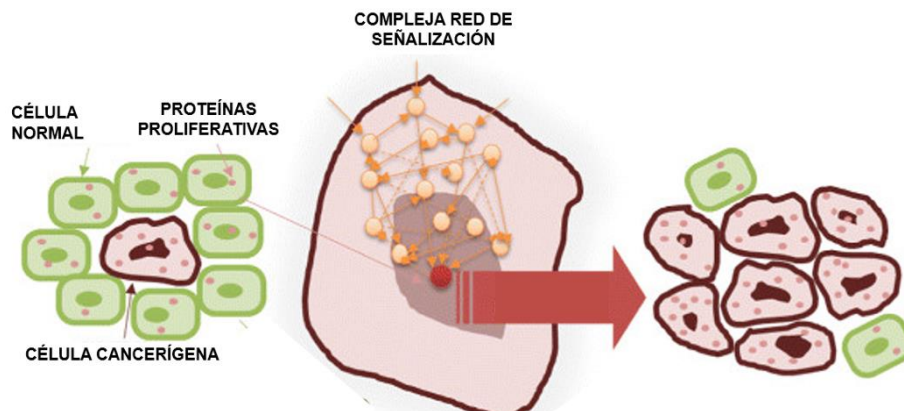


Figura 2. Proliferación de células de cáncer. Las células en color verde representan células normales y las células en color cafè a las células tumorales. La actividad de proliferación de células normales y tumorales es impulsada por una red compleja de señalización basada en interacciones de proteínas. Alteraciones en estas vías de regulación conllevan al crecimiento descontrolado de células favoreciendo la inducción de tumores (Aibar *et. al*, 2010).

Conforme las células normales evolucionan a un estado neoplásico, van adquiriendo características que las vuelven tumorigénicas y finalmente malignas (Hanahan y Weinberg, 2000). En células de cáncer los miRNAs se encuentran usualmente desregulados y pueden actuar como oncogenes o supresores de tumor. Por ello, el estudio de los miRNAs ha sido de gran interés para la identificación de nuevos blancos y estrategias terapéuticas en diversos tipos de cáncer entre los que se encuentra el de mama, que ocupa el primer lugar en incidencia en mujeres a nivel mundial.

2.3 Cáncer de mama

El cáncer de mama se define como aquel cáncer que se origina en los tejidos de la mama. Se puede presentar un carcinoma ductal, que comienza en el revestimiento de los conductos delgados que se encargan de transportar leche de los lobulillos hacia el pezón o bien un carcinoma lobulillar, que se forma en los lobulillos (glándulas lácteas) de la mama. Este puede evolucionar hasta diseminarse desde el sitio en el que se originó (conductos de la mama o lobulillos) hasta el tejido normal circundante (NCI, 2018). De acuerdo con estadísticas mundiales en el 2020 se reportaron 2.2 millones de nuevos casos de cáncer de mama (GLOBOCAN, 2020). Mientras que en México en ese mismo año se detectaron 29,929 (INEGI, 2020).

La clasificación del cáncer de mama se basa en el grado de invasión o diseminación al momento de realizar el diagnóstico, esta información es importante al momento de

seleccionar la estrategia terapéutica a seguir (Sánchez, 2013). Existen diversos sistemas de clasificación del cáncer mamario entre los que se encuentra la clasificación histológica, el sistema de estadificación del cáncer TNM y la clasificación molecular.

2.3.1 Clasificación histológica del cáncer de mama

Se denomina “carcinoma” a aquel cáncer derivado de células epiteliales, que se encuentran cubriendo las glándulas y ductos de las mamas, la gran mayoría de las neoplasias en las mamas pertenecen a la categoría de carcinomas. La distinción entre células benignas y malignas es que estas últimas presentan una actividad invasiva. Todos los carcinomas de la mama independientemente de si son o no invasivos, se clasifican en base a sus características histológicas y citológicas. Algunas de estas características son: sitio donde apareció, tamaño, consistencia, forma, color, relación con la mama adyacente, así como las estructuras extramamarias, y el número de sitios con apariencia maligna (Costa, 2014).

El carcinoma *in situ* son células epiteliales de actividad anormal que no han podido invadir tejidos circundantes, pero que morfológicamente presentan características similares a las células invasivas. Recientemente, se ha sugerido que la transición de tejido normal a carcinoma *in situ* y finalmente a carcinoma invasivo comprende varios cambios a nivel molecular mucho más complejos de lo que se puede apreciar en un microscopio (Ibarra, 2014). Adicionalmente, se ha observado que no en todos los casos los pacientes con carcinoma *in situ* evolucionan a carcinoma invasivo, incluso cuando no se han recibido terapia. El cáncer de mama se puede clasificar como carcinoma *in situ* y carcinoma invasivo o infiltrante. El carcinoma *in situ* a su vez, se subclasifica en lobular y ductal. Este último se origina en las células de los ductos de la mama y presenta mayor incidencia que el carcinoma lobular *in situ*, el cual inicia en los lóbulos (Ibarra, 2014). Por otro lado, el carcinoma ductal invasivo tiene su origen en el conducto lácteo, pero se disemina en el tejido normal adyacente dentro de la mama (Reynoso, 2013).

2.3.2 Clasificación Tamaño-Nodos-Metastasis (TNM) del cáncer de mama

El sistema TNM clasifica a este tipo de cáncer por etapas, basandose en el tamaño del tumor (T), en su extensión hacia ganglios linfáticos o nodos (N) y en su capacidad de metastatizar o diseminarse hacia otros órganos y tejidos (M) (Santaballa, 2017).

La categoría T (tamaño) se refiere al tumor original (primario):

TX: Indica que no se puede medir o no se encuentra el tumor.

T0: Refiere que no hay evidencia de que exista un tumor primario.

Tis: Significa que el cáncer es "*in situ*"

T1: El tumor tiene un tamaño de 20 milímetros (mm) o menos. Es decir, menor a una pulgada. Este estadio se clasifica en 4 subestadios de acuerdo al tamaño tumoral:

T1mi: Tumor con un tamaño ≤ 1 mm.

T1a: Tumor con tamaño >1 mm, pero <5 mm

T1b: Tumor con tamaño >5 mm y <10 mm

T1c: Tumor con un tamaño >10 mm y <20 mm

T2: el tumor tiene un tamaño >20 mm, pero <50 mm.

T3: el tumor tiene un tamaño >50 mm.

T4: el tumor pasa a clasificarse en alguno de los siguientes grupos:

T4a: El tamaño del tumor se encuentra afectando la pared torácica.

T4b: El tamaño del tumor ha afectado hasta la piel.

T4c: El tamaño del tumor ha afectado tanto la pared torácica como la piel.

T4d: El cáncer es del tipo inflamatorio (ASCO, 2019)

La categoría N (daño en los ganglios linfáticos o nódulos) menciona si el cáncer ha alcanzado los nódulos o ganglios linfáticos cercanos:

NX: No se puede medir o encontrar el tumor en los ganglios.

N0: Indica que no hay cáncer en los ganglios linfáticos cercanos.
N1, N2, N3: dependen de la cantidad de ganglios linfáticos comprometidos y el nivel de cáncer. Entre más alto sea el número de ganglios afectados (número G) mayor será el nivel de afectación. (ASCO, 2019)

La categoría M (metástasis) indica si el cáncer se ha extendido o no hacia otros órganos o tejidos

MX: No se puede o medir o encontrar metástasis.

M0: No hay metástasis distal.

M1: Hay metástasis distal. (ASCO, 2019)

2.3.3 Clasificación molecular del cáncer de mama

La clasificación molecular propone cuatro subtipos, esto de acuerdo a la presencia del receptor hormonal estrógeno (RE), el receptor hormonal progesterona (RP), el oncogén HER2 y los niveles de ki-67, un gen relacionado con la proliferación celular. Dichos subtipos se conocen como: Luminal A (receptores hormonales positivos, HER2 negativo, bajo ki-67), Luminal B (receptores hormonales positivos, HER2 negativo, alto ki-67), HER2 (positivo para HER2 sin importar el estatus de los receptores hormonales) y finalmente el subtipo basal like que puede llegar a confundirse con el término triple negativo, sin embargo se ha demostrado que un 14% de los tumores de este subtipo pueden llegar a ser positivos para marcadores hormonales y HER2, mientras que el 44% de los tumores triple negativos no presentan expresión de ninguno de los tres marcadores (Olaya Guzmán, 2010).

Determinar el subtipo permite en muchos casos predecir la evolución clínica y la elección del mejor tratamiento. Por ejemplo, el subtipo luminal A tiene el mejor pronóstico pues reacciona favorablemente a las terapias endocrinas, el tipo luminal B es menos responsivo que el subtipo A. El subtipo HER2 responde favorablemente a terapias dirigidas a HER2 (Koh y Kim, 2018), y finalmente el subtipo parecido al basal (basal like) considerado un reto clínico por su agresividad, alta tasa de recaída e incidencia en mujeres jóvenes presenta mayores limitaciones terapéuticas en comparación con los otros subtipos y por ende el peor pronóstico (Toft, 2021). Esta clasificación, en conjunto con la clasificación

histológica y el estadio del cáncer, permite ofrecer al paciente un mejor diagnóstico, pronóstico y tratamiento.

2.3.4 Tratamientos en cáncer de mama

Aunque la cirugía es el tratamiento primario en las etapas tempranas del cáncer de mama, existen otras herramientas terapéuticas como la quimioterapia, radioterapia y terapia hormonal, las cuales han aumentado significativamente la tasa de supervivencia (Siegel et al., 2018). En las etapas tardías de la enfermedad (etapa IV), la quimioterapia y la radioterapia son los principales tratamientos, en conjunto con la terapia hormonal (Rossi et al., 2013).

Sin embargo, en los últimos 60 años, se han realizado descubrimientos en biología molecular, inmunología y virología que han dado paso al desarrollo de nuevas terapias que complementen a las ya existentes en cáncer. Recientemente, los miRNAs han ganado importancia como herramientas terapéuticas y de pronóstico del cáncer, debido a esto se han propuesto diferentes enfoques para manipular su expresión, dos maneras en las que una terapia basada en miRNAs puede ser usada como tratamiento anticáncer son 1) antagonizando miRNAs oncogénicos que se encuentran sobreexpresados por medio de oligonucleótidos (inhibidores de miRNAs) que prevengan la interacción con su RNAm blanco 2) aumentando la acción de miRNAs con actividad de supresores de tumor mediante el uso de imitadores de miRNA (mimics) (Mandujano et al., 2018).

2.4 MiRNAs en la proliferación del cáncer de mama

Como se ha mencionado anteriormente, los miRNAs poseen la capacidad de regular cientos de genes simultáneamente. Investigaciones anteriores los han reconocido como importantes moduladores de vías celulares relacionadas a cáncer (Garofalo *et al*, 2011). Por lo tanto, no es de extrañarse que sean candidatos atractivos para su estudio en la progresión de cáncer de mama.

En 2005 Iorio et. al, reportaron que la expresión de miRNAs se encuentra alterada en pacientes con cáncer mamario y demostraron que los miRNAs 10b, 125b y 145 actúan como supresores de tumor. Mientras que el miR-21 y miR-155 presentan actividad de oncogenes (Iorio et al., 2005). A partir de este descubrimiento se han publicado

numerosas investigaciones mostrando la participación de diferentes miRNAs en la proliferación del cáncer de mama. Por ejemplo, se ha reportado que la sobreexpresión de miR-497 en células de cáncer de mama induce arresto celular en fase G1 mediante desregulación de la ciclina E1 (Luo *et al*, 2013). Por otra parte, se ha observado que la subexpresión del miR-497 en muestras de suero de pacientes con cáncer mmario RE- se relaciona con una mejor supervivencia, mientras que una alta expresión en el subtipo HER2+ es un indicador para un mejor pronóstico (Han *et al*, 2016) También se ha reportado que miRNAs como miR-26b, miR-107 y miembros del cluster miR-195/425 participan en la proliferación celular, formación de colonias, arresto celular G0/G1 y apoptosis mediante la desregulación de diversos “reguladores maestros” como ciclina E1, CDK8 y MCL-1 (Di Leva *et al*, 2013). MiR-199b-5p interfiere en la proliferación mediante la regulación de genes específicos, importantes en vías de señalización proliferativas como el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), la subunidad gamma 1 de laminina (LAMC1), la quinasa 3 de linaje mixto (MLK3) (Yoo *et al*, 2014). La sobreexpresión del cluster miR-221/222 en células de subtipo “basal-like” altamente invasivas contribuye como un importante promotor de la proliferación a través de la desregulación de diversos factores supresores de tumor y transductores de señal como SOCS1, STAT5A, CDKN1B y PTEN/Akt (Li *et al*, 2016). En 2017 se encontró que la desregulación de 33 miRNAs en los esferoides multicelulares de la línea MCF-7 están relacionados con la regulación de su proliferación, en particular, bajos niveles del miR-221 y altos niveles de miR-138, están relacionados con la generación de subpoblaciones de células senescentes (Mandujano-Tinoco, 2017). MiR-27b puede tener acción pro o antiproliferativa, dependiendo del tipo específico de cáncer, Chen y colaboradores encontraron que los niveles de miR-27b disminuyeron en los tejidos del cáncer de mama, y su regulación a la alta inhibió significativamente la proliferación y promovió la apoptosis mediante la subexpresión de sus genes blanco, como CBLB y GRB2, que inactivan las vías de señalización MAPK/Erk y PI3K/Akt (Chen *et al*, 2018).

La participación de estos y otros miRNAs en las marcas distintivas del cáncer de mama como proliferación, migración, invasión y angiogénesis se esquematizan en la figura 3.

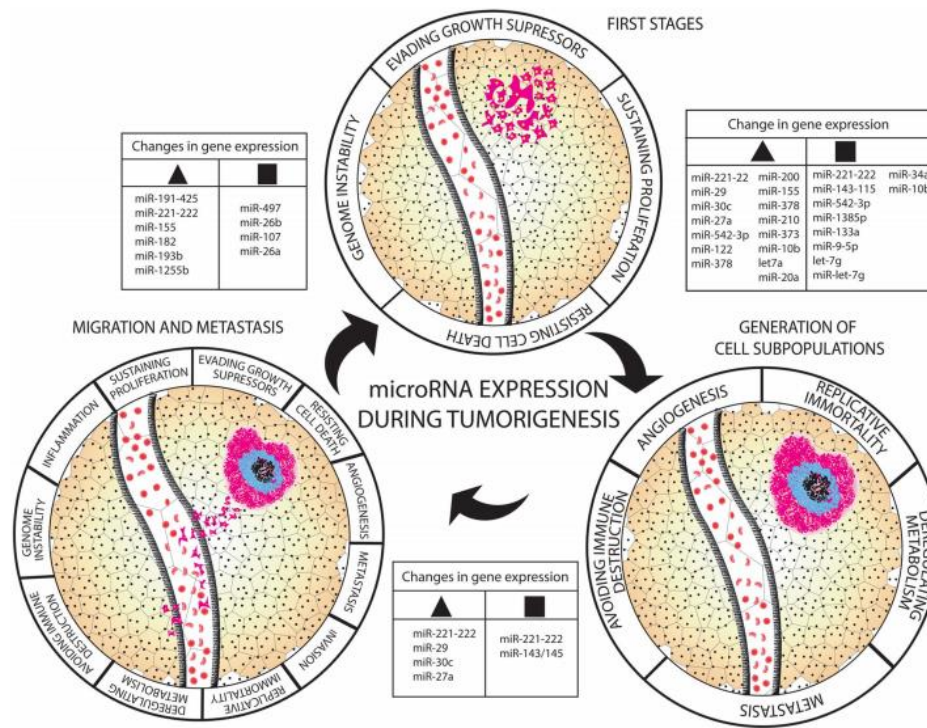


Figura 3. Participación de los miRNAs en la progresión del cáncer de mama. El triángulo representa regulación positiva, el cuadro representa regulación negativa. Durante las primeras marcas del cáncer (proliferación, resistencia a la muerte celular e inestabilidad genómica) varios miRNAs se encuentran desregulados, conforme avanza la carcinogénesis los miRNAs modulan la progresión de nuevas marcas (metástasis y angiogénesis) Finalmente, cuando el cáncer ha avanzado a sus etapas más agresivas los miRNAs participan activamente en la formación del nuevo tumor (Mandujano et al, 2018).

La identificación de miRNAs asociados a un mal pronóstico o baja supervivencia en cáncer de mama, así como la determinación de la función, podría permitir conocer mejor los mecanismos a través de los cuales, los miRNAs favorecen la progresión del cáncer mamario.

2.5 MiRNAs como blancos terapéuticos

Diversas investigaciones han identificado más de 1,000 miRNAs en seres humanos, a través de múltiples experimentos y del uso de herramientas bioinformáticas (Liu et al, 2011). Una de las herramientas bioinformáticas utilizadas actualmente para la búsqueda de miRNAs como blancos terapéuticos es el TCGA (The Cancer Genome Atlas), la cual

cataloga los cambios moleculares de importancia biológica responsables de la aparición de cáncer, a través de mapas multidimensionales en 33 diferentes tipos de cáncer. Su base de datos consta de 2.5 petabytes, los cuales describen el tejido tumoral y tejidos normales emparejados de más de 11,000 pacientes haciendo uso de la secuenciación genómica por varios métodos como OncoLnc, herramienta que explora correlaciones de supervivencia y datos clínicos asociados a la expresión de mRNAs y miRNAs (NCI, 2019).

Nuestro laboratorio en colaboración con el MD Anderson Cancer Center realizó un análisis de expresión empleando la base de datos TCGA (The Cancer Genome Atlas). El resultado nos permitió identificar al miR-660 como significativamente sobreexpresado en muestras de tejido tumoral (Figura 4.A). Se encontró además que dicha sobreexpresión está relacionada con una baja supervivencia en pacientes con cáncer mamario (Figura 4.B).

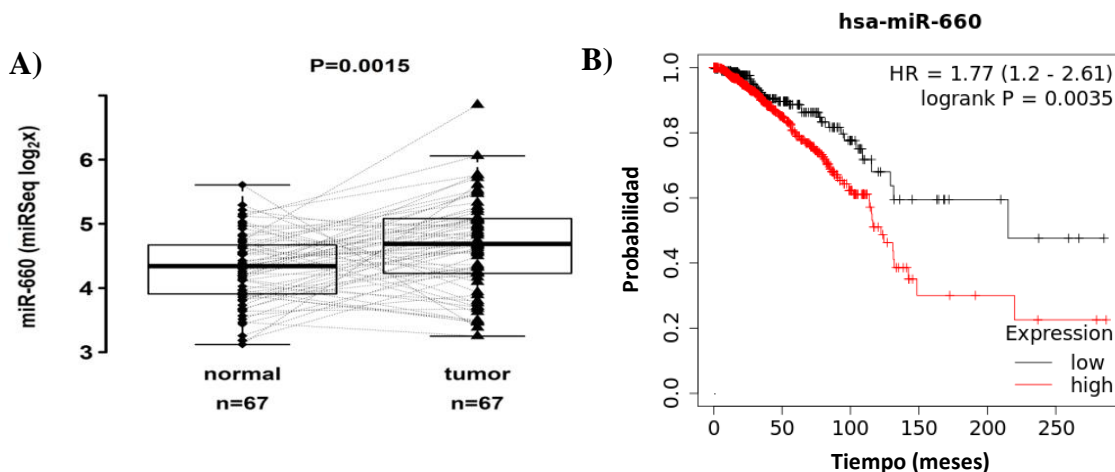


Figura 4. Expresión del miR-660 en muestras de tejido tumoral y normal mamario. La secuenciación de miRNAs se llevó a cabo a partir de muestras de tejido tumoral y tejido normal de la mama sana de cada paciente (n=67). En las gráficas se muestra la sobreexpresión del miRNA 660 (A) ($p=0.0015$) en las muestras tumorales en comparación con las normales. Las gráficas de supervivencia global de pacientes de cáncer mamario muestran que una alta expresión (en rojo) del miR-660 (B) disminuye significativamente la supervivencia de estos pacientes. La baja expresión (en negro) de los mismos incrementa significativamente la supervivencia (Ivan, 2017).

En referencia a la actividad que presenta el miR-660 en la progresión del cáncer, se ha observado que participa como oncogén en leucemia mieloide crónica (Salati et al., 2017), en cáncer de pulmón presenta una actividad de represor tumoral a través de la vía miRNA-660-5p-MDM2-p53 (Borzi et al., 2017), en osteosarcoma inhibe la proliferación

e invasión con FOXO1 como blanco directo (Zhang et al., 2018), su inhibición en cáncer renal favorece la proliferación, invasión, migración y apoptosis (Zhao et al, 2017).

En cáncer de mama Krishman *et al.* reportaron que el miR-660 se encuentra sobreexpresado en pacientes con cáncer de mama (Krishman et, al 2015). Shen *et. al.*, observaron que la inhibición del miR-660 suprime la proliferación, migración e invasión, y que además induce la apoptosis de las células de cáncer de mama humano (RE+ MCF-7) a través de la vía miR-660-5p / TFCP2 / CDKN1A (Shen et. al, 2017). Se ha reportado que CDKN1A participa de forma crucial en el arresto del ciclo celular, proliferación y la inhibición de la migración (Abbas y Dutta, 2009) TCP2 lo regula directamente, el trabajo propone a miR-660 como regulador de CDKN1A a través de TCP2. Sin embargo, algunos de los resultados obtenidos requieren ser analizados con mayor detalle para llegar a una adecuada conclusión ya que no se realizó la validación de la participación de TFCP2 y p21 en cada uno de los procesos de proliferación, migración e invasión, la cual es necesaria para poder concluir que es a través de p21 que el miRNA 660 induce a estos tres procesos en las células de cáncer de mama MCF-7 (RE+).

Peng *et al*, reporta que miR-660 promueve la progresión del cáncer de mama en las líneas celulares MCF-7 (RE+) y MDA-MB-231 (RE-) (Peng et.al, 2020). través de la modulación de TET2 y la vía PI3K/AKT/mTOR, señalización implicada en la modulación de la proliferación, invasión y migración, dicha vía se ha encontrado mutada en cáncer de mama (Guerrero *et al*, 2016). Sin embargo, como se mencionó en secciones anteriores un solo miRNA es capaz de regular diversos blancos. Por lo que, en este proyecto nos propusimos determinar el papel del miR-660 en la proliferación,

3. JUSTIFICACIÓN

El análisis en la base de datos del TCGA sobre la expresión de miRNAs en cáncer mamario nos permitió seleccionar al miR-660 como un posible miRNA implicado en la progresión de la enfermedad, al encontrarse significativamente sobreexpresado y asociado a una baja supervivencia en los pacientes con cáncer mamario. Recientemente, se ha reportado que el miR-660 induce proliferación, a través de la vía miR-660/TFCP2/CDKN1A en células de cáncer de mama MCF-7 (RE+) y miR-660/TET2/PI3K/AKT/mTOR en MCF-7 (RE+) y MDA-MB-231 (RE-). Sin embargo, un solo miRNA es capaz de regular diversos blancos y vías de señalización simultáneamente, por lo que, al formar parte de un proyecto más amplio y completo, nuestra investigación, permitirá identificar nuevos blancos y vías específicas del miR-660 asociados a la proliferación del cáncer mamario RE+ y RE-, ampliando lo ya reportado hasta el momento del miR-660 en cáncer de mama.

4. HIPOTÉISIS

La sobreexpresión del miR-660 favorece la proliferación de las células de cáncer de mama RE+ (MCF-7) y RE- (MDA-MB-231).

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto funcional del miR-660 en la proliferación del cáncer mamario RE+ y RE-.

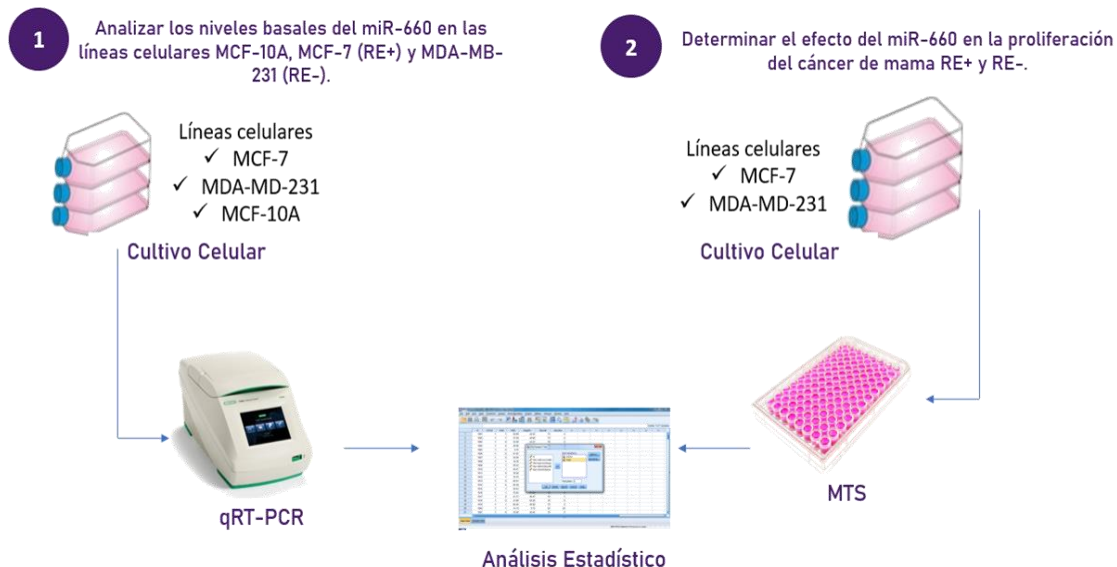
6. OBJETIVO ESPECÍFICOS

Analizar los niveles basales del miR-660 en las líneas celulares MCF-10A, MCF-7 (RE+) y MDA-MB-231 (RE-).

Determinar el efecto del miR-660 en la proliferación del cáncer de mama RE+ y RE-.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Estrategia Experimental



7.2 Cultivo celular

Se realizó el cultivo de las células de cáncer de mama MCF-7 (RE+) obtenida de la ATCC y MDA-MB-231 (RE-) facilitada por la Dra. Rocío Ortiz López, ambas líneas fueron mantenidas en medio DMEM (Sigma Aldrich), adicionado con suero fetal bovino al 10% (Invitrogen, Waltham) y penicilina/estreptomicina al 1% (Invitrogen, Waltham). La línea epitelial no tumorigénica MCF-10A fue amablemente donada a nuestro laboratorio por el Dr. Oscar Raúl Fajardo Ramírez y fue cultivada en medio MEBM (Lonza, Valais) adicionado con 2 ml de extracto de pituitaria bovina (BPE), 0.5 ml de factor de crecimiento epidermal humano (hEGF), 0.5 ml de insulina, 0.5 ml de hidrocortisona, 0.5 ml de gentamicina-anfoteicina B y 50 µl de toxina del cólera. Las condiciones de cultivo para todas las líneas celulares empleadas fueron una temperatura de 37 °C en una atmósfera de 95% oxígeno y 5% CO₂.

7.3 Extracción de RNA de las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 (RE+) y MDA-MB-231 (RE-) y la línea control MCF-10A.

Se realizó la extracción de RNA de tres muestras biológicas de las células de cáncer de mama MCF-7 (RE+) y MDA-MB-231 (RE-) y la línea control no tumorigénica MCF-10A empleando el kit de extracción miRNeasy Mini Kit™ (Qiagen, Venlo), siguiendo el protocolo del fabricante y empleando un pellet de 800,000 a 1 millón de células por extracción. Una vez obtenido el RNA se procedió a cuantificar el contenido de RNAs pequeños con el kit microRNA Assay Kit™ (Invitrogen, Waltham) en el equipo Qubit 4.0™ (Thermo Scientific, Wilmington). Las muestras de RNA fueron almacenadas a una temperatura de -80°C hasta su uso.

7.4 Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (qRT-PCR)

Para llevar a cabo la determinación de los niveles basales del miR-660 en las células de cáncer de mama y la línea control se procedió a realizar la técnica de qRT-PCR comenzando por la síntesis de cDNA empleando el MystiCq microRNA cDNA Synthesis Mix (Merck, Darmstadt) siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, los componentes del kit se centrifugaron y descongelaron para llevar a cabo la preparación de la siguiente mezcla de síntesis:

Tabla 1. Mezcla de reacción para primer paso de síntesis de cDNA

Componente	Volumen
Buffer de cola de poly(A) (5x)	2 µL
RNA	µL necesarios para añadir 834 ng de RNA
Agua libre de RNAsas	µL necesarios para ajustar a volumen final
Poly (A) polimerasa	1 µL
Volumen final	10 µL

Esta mezcla se dejó incubar por 60 minutos a 37 °C, seguido de 5 minutos a 70 °C. Después, se añadieron los siguientes reactivos para completar la reacción de síntesis de cDNA.

Tabla 2. Mezcla de reacción para segundo paso de síntesis de cDNA

Componente	Volumen
MicroRNA cDNA reaction mix	9 µL
Reacción paso 1	10 µL
qScript Reverse Transcriptase	1 µL
Volumen Final	20 µL

Esta reacción se dejó incubar por 20 minutos a 42 °C seguido de 5 minutos a 8.5°C.

Una vez completada la síntesis de cDNA se procedió al análisis por qRT-PCR empleando el kit MystiCq microRNA SYBR Green qPCR Ready Mix (Merck, Darmstadt) añadiendo para cada reacción los siguientes componentes:

Tabla 3. Mezcla de reacción para análisis qRT-PCR

Componente	Volumen
PerfeCta SYBR Green SuperMix (2X)	25 µL
Primers (10µM)	1 µL
PerfeCta Universal PCR Primer (10µM)	1 µL
MicroRNA cDNA	1 µL
Agua libre de nucleasas	22 µL
Volumen Final	50 µL

Las condiciones de la reacción de qRT-PCR se describen a continuación:

Pre-incubación/activación: 95°C, 2 minutos

PCR (40 ciclos)

Desnaturalización: 95°C, 5 segundos

Alineamiento: 60°C, 30 segundos

El análisis de los datos se realizó empleando el método comparativo cycle threshold ($2^{-\Delta\Delta CT}$). (Livak y Schmittgen, 2001)

7.5 Transfección de las líneas celulares de cáncer de mama en placa de 96 pozos

Para la transfección de las células con el inhibidor del miR-660 y su respectivo control negativo, preparamos alícuotas de 10 μ M del inhibidor y del control, tomando 5 μ L de la solución stock (100 μ M) y añadiendo 45 μ L de agua nanopura. Por cada pozo se empleó un volumen de 98.5 μ L de medio bajo en suero Optimem™ (Gibco, Waltham), se añadieron 0.5 μ L del inhibidor del miR-660 [10 μ M] para una concentración final de 50 nM en un volumen de 100 μ L, finalmente se agregó 1 μ L de agente de transfección Hiperfect™ (Qiagen, Venlo) para una relación 1:2 del inhibidor del mirna y el agente de transfección.

Se dejó incubar por un periodo de 20 minutos a temperatura ambiente, para permitir la formación de los complejos de transfección. Después de 24 horas, se retiró la solución de transfección de los pozos y se reemplazó con 100 μ L de medio DMEM con 10% de suero fetal bovino y 1% antibiótico.

7.6 Eficiencia de transfección

En placas de 6 pozos se sembraron 90,000 células/pozo de la línea MDA-MB-231 en medio DMEM con 10% SFB y 1% antibiótico. Al cabo de 24 h se siguió el protocolo de transfección descrito en la sección 7.4 adaptando los volúmenes a placa de 6 pozos, donde por cada pozo se empleó un volumen de 1,970 μ L de medio Optimem (Gibco, Waltham), después se añadieron 10 μ L del inhibidor y/o control negativo del miR-660 [10 μ M] para una concentración final de 50 nM en un volumen 2,000 μ L, finalmente se agregaron 20 μ L de agente de transfección Hiperfect (Qiagen, Venlo), respetando la relación 1:2. Se dejó incubar por un periodo de 20 minutos a temperatura ambiente, para permitir la formación de los complejos de transfección. Después de 24 horas, se retiró la solución de transfección de los pozos y se reemplazó con 2,000 μ L de medio DMEM con suero fetal bovino al 10% y antibiótico al 1%.

Después de 48 h se realizó la extracción de todos los pozos empleando el kit de extracción miRNeasy Mini Kit™ (Qiagen, Venlo) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, una vez obtenido el RNA se procedió a la síntesis de cDNA con el kit MystiCq microRNA cDNA Synthesis Mix (Merck, Darmstadt) seguido de la cuantificación por qRT PCR con el kit MystiCq microRNA SYBR Green qPCR Ready Mix (Merck, Darmstadt) ambos pasos siguieron el protocolo descrito en la sección 7.5. Todas las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado.

7.7 Ensayo de proliferación

Para determinar el efecto que el miR-660 presenta en la proliferación de las células de cáncer de mama RE+ y RE-, realizamos ensayos de proliferación con MTS en placas de 96 pozos. Primeramente, sembramos 8,000 células MCF-7/pozo y 7,000 células MDA-MB-231/pozo, en medio DMEM con 10% SFB y 1% antibiótico. Al día siguiente, se realizó la transfección de las células (70% de confluencia), como se describió anteriormente en la sección 7.4. Setenta y dos horas después, se añadieron 10 µL del reactivo MTS (Abcam, Cambridge) por pozo. Las placas de la línea MDA-MB-231 (RE-) se incubaron por 2 horas y las de MCF-7 (RE+) por 2 h 15 m, después de este tiempo se procedió a la lectura de las placas a una longitud de onda de 490 nm, de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

Para ambas líneas se realizaron cuatro repeticiones por tratamiento y el ensayo se realizó por triplicado. Para evitar la evaporación del medio de cultivo en los pozos de tratamiento se agregaron 200 µl de medio DMEM en la periferia de la placa, además colocamos 100 µl de medio en 4 pozos como blanco, como se muestra en la figura 5.

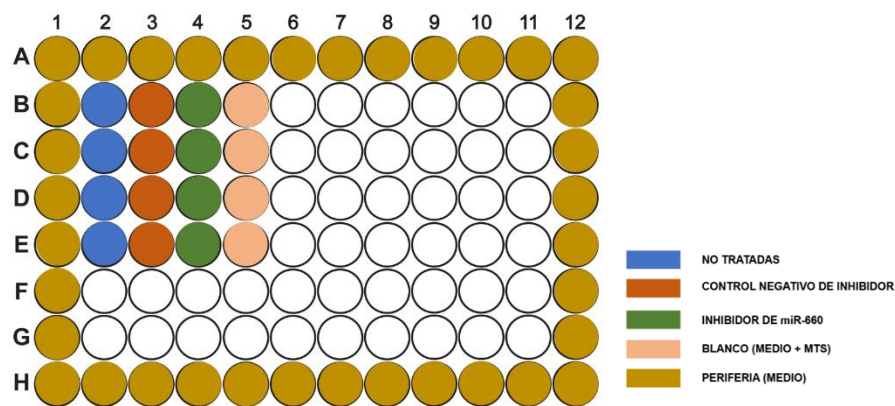


Figura 5. Esquema de la placa de 96 pozos para el ensayo de MTS. Se muestra el acomodo de las células no tratadas, células transfectadas con el inhibidor del miR-660 y/o control negativo, medio DMEM como blanco y finalmente el medio en la periferia de la placa.

7.8 Análisis Estadísticos.

Para la determinación de los niveles basales del miR-660 y eficiencia de la transfección se realizó la prueba de normalización de datos Shapiro Wilks, los datos presentaban una distribución normal por lo que se realizaron pruebas de ANOVA de una vía y de comparación múltiple de Dunnett. Para el análisis de la viabilidad celular con respecto a las células no tratadas se realizaron pruebas de normalización de datos Shapiro Wilks, los datos se comportaron de manera normal, se procedió a realizar un análisis ANOVA de una vía y comparación múltiple de Dunnett empleando el software estadístico Graph Pad 8.

8. RESULTADOS

8.1 Cuantificación de miRNAs

Una vez completada la extracción se procedió a determinar la concentración de miRNAs pequeños en las muestras de las tres líneas celulares que se utilizaron en el presente proyecto (MCF-7 (RE+), MDA-MB-231 (RE-) y MCF-10^a, empleando el flurómetro Qubit 4.0™ (Thermo Scientific, Wilmington). Las muestras con mayor concentración de miRNAs fueron las de MCF-7 seguida de MDA-MB-231 y finalmente el control MCF-10A, como se muestra en la tabla 4. Todas las muestras presentaron una concentración de miRNAs adecuada para ajustar a una concentración de 834 ng para realizar la síntesis de cDNA.

Tabla 4. Concentración de RNAs pequeños en las líneas celulares de interés.

Líneas celulares MCF-7 (RE+)	[miRNAs]
Muestra biológica 1	319 ng/ μ L
Muestra biológica 2	317.3 ng/ μ L
Muestra biológica 3	192.6 ng/ μ L
MDA-MB-231 (RE-)	[miRNAs]
Muestra biológica 1	219.9 ng/ μ L
Muestra biológica 2	229.4 ng/ μ L
Muestra biológica 3	547.4 ng/ μ L
MCF-10A (Normal)	[miRNAs]
Muestra biológica 1	124 ng/ μ L
Muestra biológica 2	165 ng/ μ L
Muestra biológica 3	213 ng/ μ L

8.2 Determinación de los niveles basales del miR-660 en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 (RE+) y MDA-MB-231 (RE-).

Los niveles basales del miR-660 en muestras de RNA de las células MCF-7 (RE+) y MDA-MB-231 (RE-) así como la línea control MCF-10A se determinaron por medio de

qRT-PCR y empleando el gen SNORD44 como control endógeno. Los ciclos de amplificación de cada una de las líneas celulares se muestran a continuación:

Tabla 5. Ciclos de amplificación en las líneas celulares de interés

Línea Celular	miR-660 Ct	SNORD44 Ct
MCF-7		
1	24.204	16.389
	24.383	16.488
2	23.82	16.362
	23.77	16.417
3	23.777	16.417
	23.583	16.362
MDA-MB-231		
1	27.383	16.688
	27.465	16.768
2	27.111	16.716
	27.343	17.063
3	27.501	16.922
	27.568	16.951
MCF-10		
1	29.41	16.692
	29.533	16.264
2	29.458	16.433
	29.468	16.679
3	29.283	16.404
	28.804	16.584

Como se observa en la figura 6 y de acuerdo con el análisis estadístico existe una sobreexpresión altamente significativa (***, $p=0.0002$) del miR-660 en la línea celular MCF-7 (RE+) con respecto al control no tumorigénico MCF-10A. De igual manera hay una sobreexpresión altamente significativa (***, $p=0.0005$) en la línea MDA-MB-231(RE-) en comparación con las células control. Además, se observa una expresión altamente significativa (***, $p=0.0003$) del miR-660 en la línea MCF-7 comparada con las células triple negativas. Nuestros resultados muestran que el miR-660 esta sobreexpresado en las células de cáncer mamario RE+ y RE-.

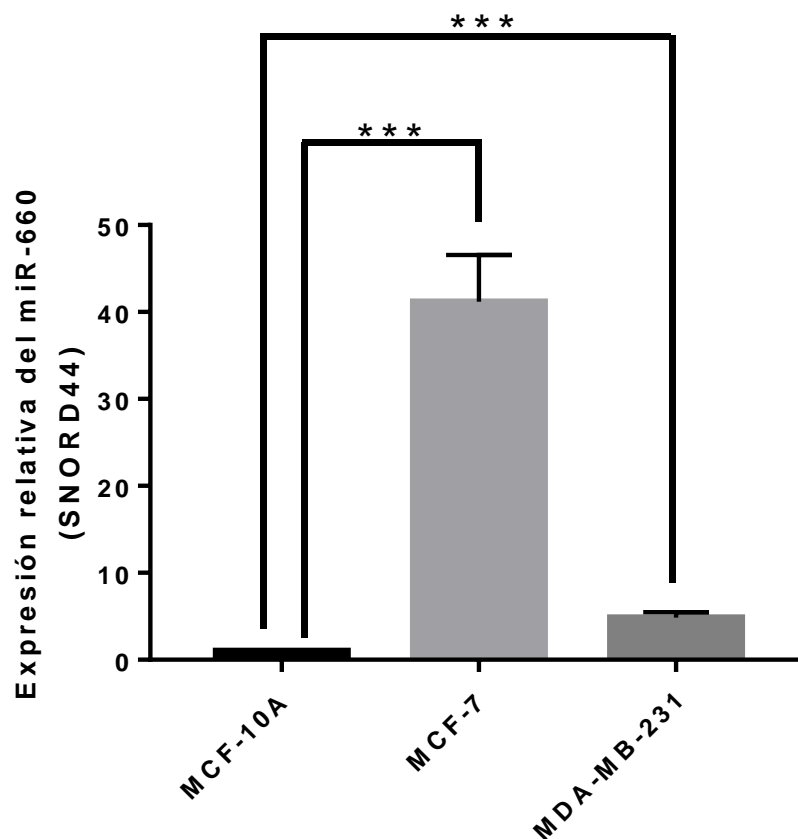


Figura 6. Niveles basales del miR-660 en las líneas de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 y las células control MCF-10A. El miR-660 se encuentra sobreexpresado en la línea celular MCF-7 (***, $p=0.0002$) y MDA-MB-231 (***, $p=0.0005$) con respecto a las células control MCF-10A. Existe una diferencia altamente significativa (***, $p=0.0003$) de expresión del miR-660 en la línea RE+ en comparación con RE-.

8.3 Eficiencia de la transfección en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 (RE-).

Para determinar si podríamos utilizar la relación 1:2 (inhibidor:agente de transfección) para llevar a cabo la transfección de líneas celulares, decidimos realizar una qRT-PCR empleando las células MDA-MB-231(RE-) no tratadas y tratadas con el agente de transfección (Hiperfect).

Nuestro análisis estadístico muestra que no existe una diferencia significativa entre los dos tratamientos (Figura 7), por lo tanto, la relación seleccionada no presenta efecto

tóxico sobre nuestras células y es seguro emplearla en la transfección celular para nuestros ensayos de proliferación.

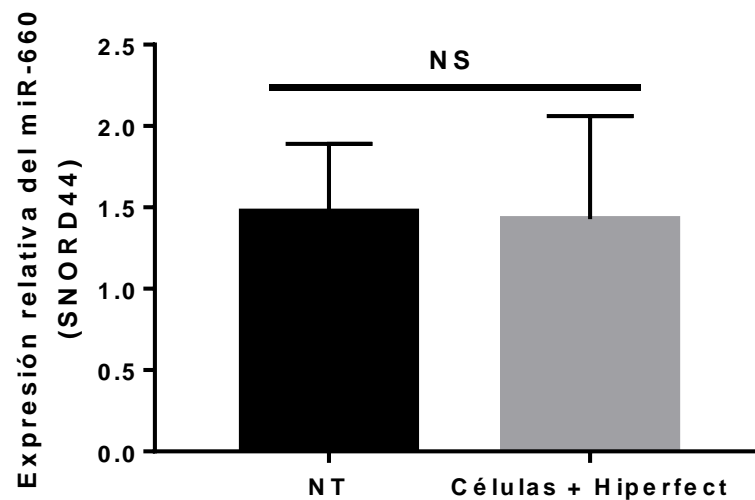


Figura 7. Niveles de expresión del miR-660 en la línea celular MDA-MB-231 a las 48 h de incubación. No existe diferencia significativa (NS) entre las células no tratadas (NT) y las células tratadas con Hiperfect (células + Hiperfect).

Para determinar si la transfección del inhibidor de miR-660 efectivamente disminuyó la expresión de nuestro miRNA de interés, llevamos a cabo su cuantificación por medio de qRT-PCR.

De acuerdo con el análisis estadístico y como se observa en la figura 8 existe una disminución significativa de la expresión del miR-660 (*, $p=0.0078$) en células RE (-) 48 horas después de la transfección con su inhibidor esto en comparación con células transfectadas con el control negativo, esto corresponde a un 90% de inhibición de la expresión respecto al control negativo (Figura 8) cuyo blanco es seleccionado de manera aleatoria, por lo tanto no interviene en la expresión del miR-660 y es ideal para realizar futuros ensayos. Se realizaron tres repeticiones de cada muestra y el ensayo se llevó a cabo por triplicado.

De acuerdo con nuestros resultados, la transfección con el inhibidor del miR-660 disminuye efectivamente la expresión mostrando buena especificidad contra nuestro miRNA de interés.

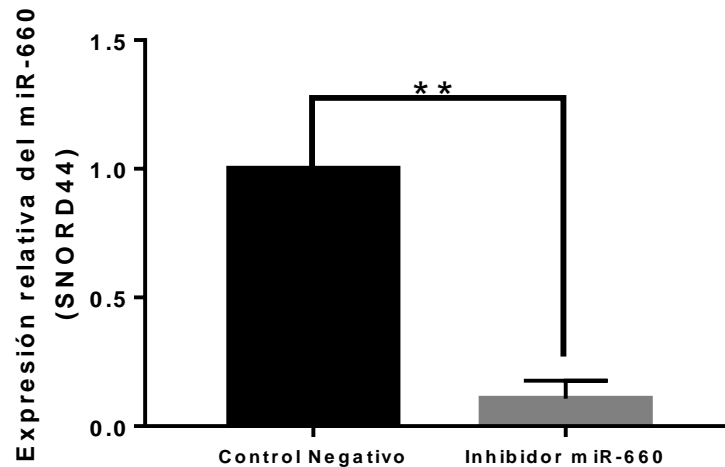


Figura 8. Niveles de expresión del miR-660 en la línea celular MDA-MB-231 48 horas después de la transfección con el inhibidor de dicho miRNA. La expresión del miR-660 se encuentra significativamente disminuida (**, $p=0.0078$) con respecto a las células transfectadas con el control negativo.

8.4 Determinación del efecto del miR-660 en la proliferación de líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 (RE+) y MDA-MB-231 (RE-)

Para determinar el papel que juega el miR-660 sobre la proliferación de las células MCF-7 (RE+) y MDA-MB-231 (RE-), se trataron estas líneas celulares con un inhibidor específico del miR-660 y su respectivo control negativo, al cabo de 24, 48 y 72 horas de incubación después de la transfección, se añadió reactivo MTS y se midió la viabilidad celular.

8.4.1 Línea celular MCF-7 (RE+)

En la línea celular MCF-7 (RE+) como se muestra en la figura 9 se puede observar que la confluencia de las células a las 24 h es similar en los pozos de los tres tratamientos, por otro lado, a las 48 y 72 horas hay una disminución de la confluencia en los pozos tratadas con inhibidor en comparación con las células no tratadas y el control negativo. En los tres tiempos no se observa diferencia significativa entre las células no tratadas y el control negativo.

De acuerdo con el análisis estadístico, a las 24 horas después de la transfección no se observa una disminución significativa de la viabilidad celular, sin embargo, el inhibidor

del miR-660 disminuyó la viabilidad celular de forma significativa y tiempo-dependiente a las 48 ($p=0.0127$) y 72 horas ($p<0.0001$) en comparación con las células no tratadas y el control negativo. Nuestros resultados muestran que la sobreexpresión del miR-660 induce un aumento en la proliferación de las células MCF-7.

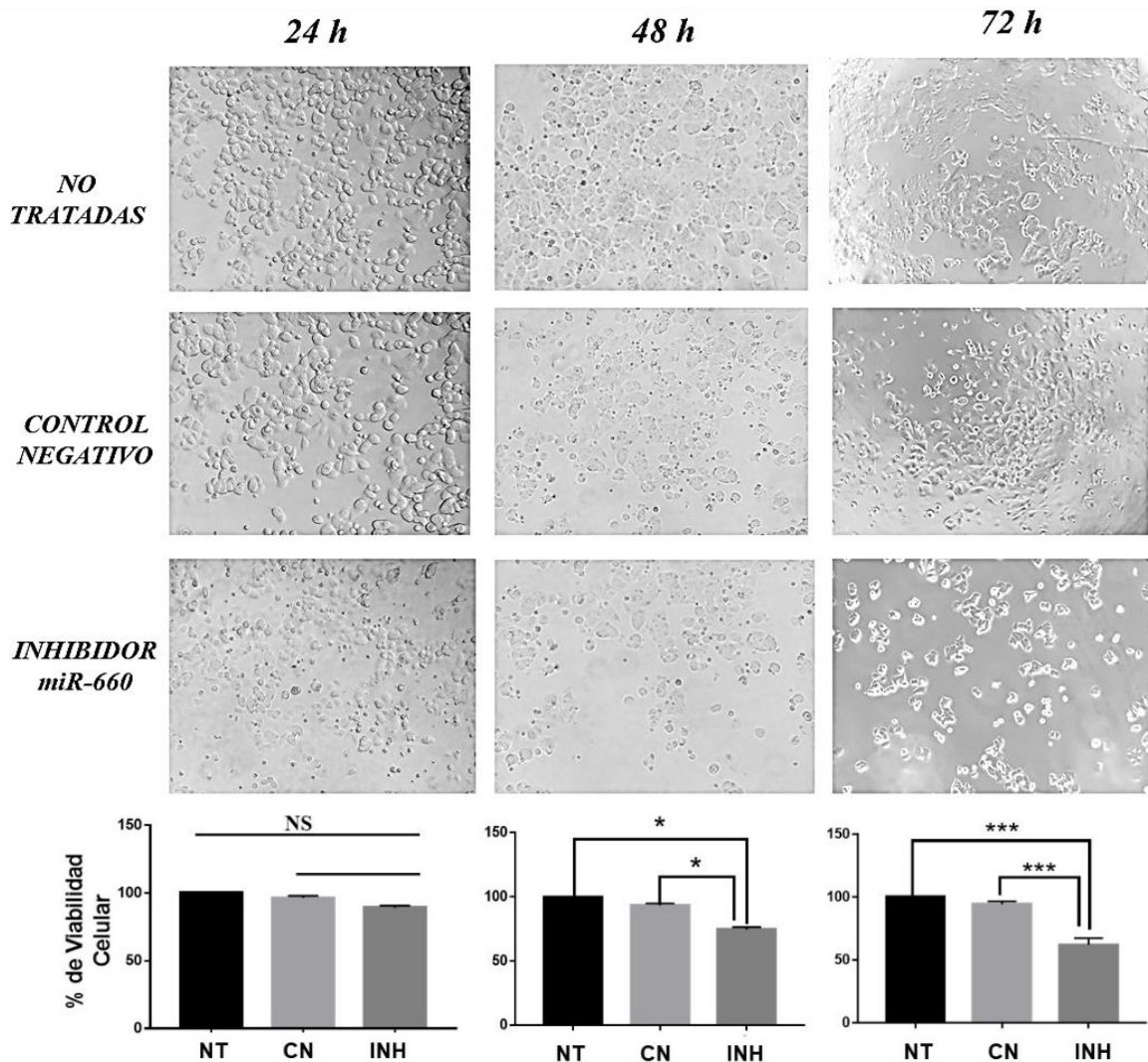


Figura 9. Efecto del miR-660 sobre la proliferación de la línea celular MCF-7 (RE+). La línea celular MCF-7 fue incubada por 24,48 y 72h bajo el siguiente esquema de tratamiento: células no tratadas (NT), células transfectadas con un inhibidor del miR-660 (INH) y células transfectadas con un control negativo (CN) del inhibidor (fotografías tomadas bajo microscopio de luz objetivo 10x). En 24 horas no se observó disminución significativa de la viabilidad celular, por otro lado, a las 48 y 72 h en las células transfectadas con el inhibidor del miR-660 la viabilidad disminuyó de forma significativa en comparación con las células no tratadas (48 h *, $p=0.0127$, 72h ***, $p<0.0001$) y tratadas con el control negativo (48 h *, $p=0.0115$, 72h ***, $p<0.0001$)

8.4.2 Línea celular MDA-MB-231

Por otro lado, en la línea celular MDA-MB-231 (RE-) y de acuerdo con las fotografías obtenidas a las 24, 48 y 72 h después de la transfección observamos una confluencia similar en los pozos pertenecientes a las células no tratadas y transfectadas con el control negativo. En las células tratadas con inhibidor se observa una disminución de la densidad celular a las 24, 48 horas y 72 horas (Figura 10).

El análisis estadístico muestra que el inhibidor del miR-660 redujo la viabilidad celular de forma significativa y tiempo-dependiente a las 24 (***, $p < 0.0001$), 48 (***, $p < 0.0001$) y 72 horas (***, $p < 0.0001$) en comparación con los controles (Figura 10).

De acuerdo con nuestros resultados la sobreexpresión de miR-660 induce la proliferación de las células MDA-MB-231 (RE-).

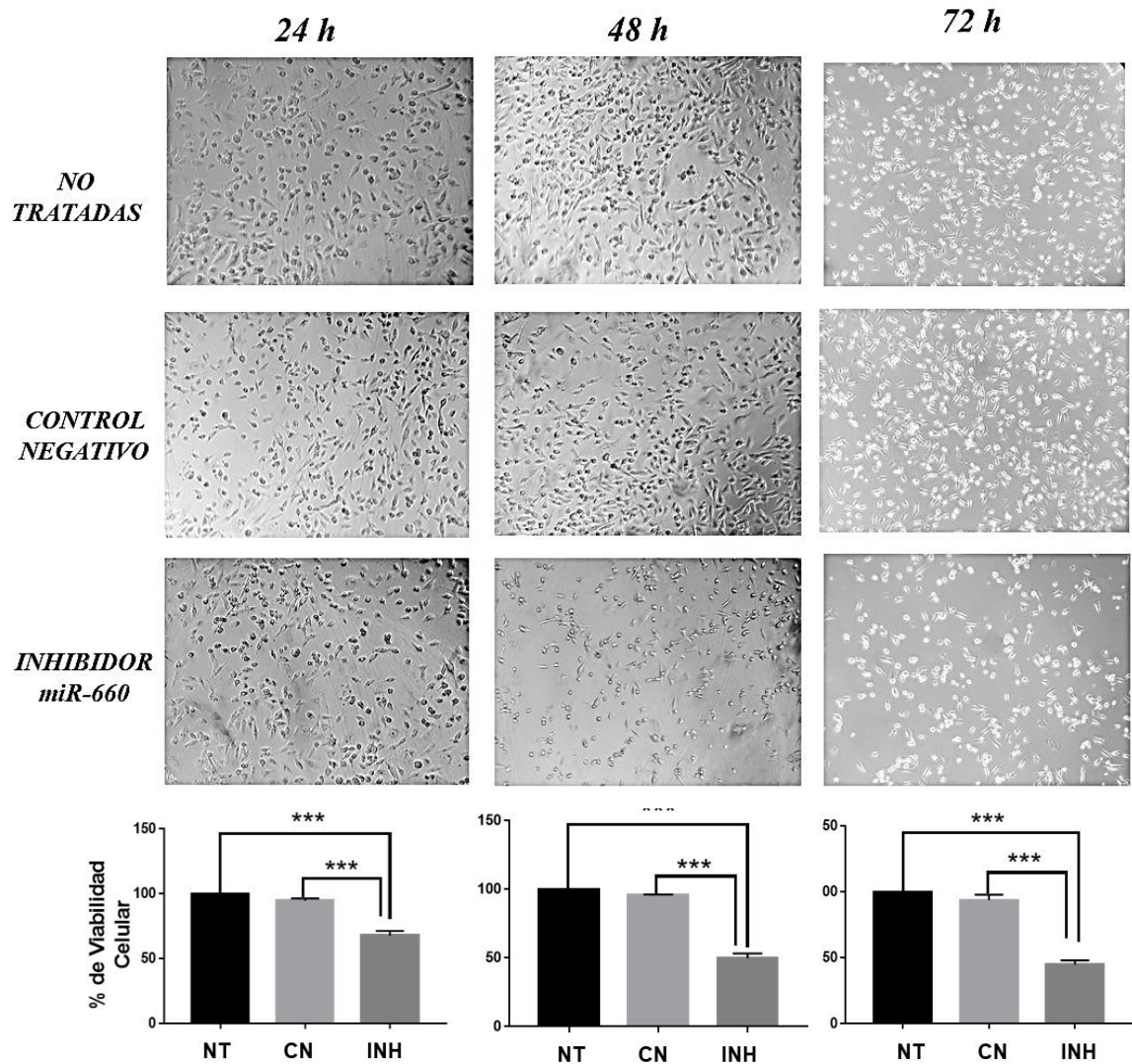


Figura 10. Efecto del inhibidor del miR-660 sobre la proliferación de la línea celular MDA-MB-231 (RE-). La línea celular MDA-MB-231 (RE-) fue incubada 48, 24 y 72h bajo el siguiente esquema de tratamiento: células no tratadas (NT), células transfectadas con un inhibidor del miR-660 (INH) y células transfectadas con un control negativo (CN) del inhibidor (fotografías tomadas bajo microscopio de luz objetivo 10x). En las células transfectadas con el inhibidor del miR-660 la viabilidad disminuyó de forma significativa a las 24 (***, $p < 0.0001$), 48 (***, $p < 0.0001$) y 72 horas (***, $p < 0.0001$) en comparación con las células no tratadas y el control negativo 24 h (***, $p < 0.0001$), 48 h (***, $p < 0.0001$) y 72 horas (***, $p < 0.0001$).

9. DISCUSIÓN

En el presente trabajo encontramos que existe una sobreexpresión del miR-660 en las células de cáncer mamario de los subtipos RE+ (MCF-7) y RE- (MDA-MB-231) en comparación con las células control MCF-10A. Esta sobreexpresión es mayor en las células del subtipo RE+. En los ensayos de proliferación de ambas células se observó que la sobreexpresión del miR-660 induce proliferación celular, teniendo un mayor efecto en las células triple negativas.

En 2017 Shen y colaboradores reportaron que existe una sobreexpresión significativa del miR-660 en las células MCF-7 y MDA-MB-231 en comparación con el control CCD-1095Sk una línea de fibroblastos normales de mama, no existe mención del control endógeno empleado en este trabajo. De acuerdo con Shen, MCF-7 presenta una mayor sobreexpresión en comparación con la línea triple negativa (Shen et al, 2017). Zhou et al evaluaron un panel de células de cáncer de mama empleando MCF-10A como control normal y U6 como normalizador, reportando una expresión a la baja en las células MCF-7 y MDA-MB-231 en comparación con la línea control (Zhou et al, 2019). Recientemente, Peng et al encontraron sobreexpresión del miR-660 en la línea celular MCF-7 y MDA-MB-231 en su análisis, empleando MCF-10A como células control y U6 como normalizador, además observaron una mayor sobreexpresión en la línea RE+ vs RE-, este perfil de expresión es similar a lo reportado por Shen et al en 2017 (Peng et al, 2020).

Los estudios mencionados anteriormente varían con nuestro estudio en el empleo del gen normalizador utilizado, por otro lado, a excepción de Shen et al en todos se empleó MCF-10A como control normal. En nuestro trabajo se seleccionó como normalizador endógeno primeramente el RNU6 ya que de acuerdo con varios reportes es el gen de referencia más común en estudios de niveles de expresión de miRNAs en líneas celulares (Benz et al, 2013), sin embargo, en nuestro análisis encontramos que la expresión de este gen era estable en las líneas de cáncer de mama, pero presentaba variaciones de expresión en nuestras líneas control MCF-10A. Lo cual contrasta con lo reportado por Zhou y Peng, quienes emplearon RNU6 como normalizador. Sin embargo, el patrón de expresión encontrado en ambos artículos difiere a pesar de haber utilizado el mismo normalizador

y las mismas líneas celulares. Existen algunos reportes que demuestran que el RNU6 puede comportarse de manera inestable en ciertas líneas celulares, tejidos y suero de pacientes con cáncer. En 2016, Andreassen et al, evaluaron 10 genes endógenos de referencia y encontraron que RNU6B presenta altas variaciones de valores Ct y amplificaciones a ciclos fuera de rango a través de 6 líneas celulares entre ellas MCF-7 y HeLa (Andreassen et al, 2016).

En otro reporte, se demostró que en las líneas celulares de cáncer de próstata AR+, LnCaP, 22RV1, y PC-3 RNU6 es el gen de referencia menos estable (Zhao et al, 2018), con resultados similares en tejido de carcinomas cervicales (Leitao et al, 2014). Los niveles de U6 también se encuentran elevados en tejido de individuos con cáncer de mama en comparación con su tejido adyacente sano, tanto en el carcinoma como en tejido adyacente la expresión es mayor en células epiteliales que en células mesenquimales (Lou et al, 2015) sugiriendo un nivel considerable de variabilidad de expresión de RNU6 entre diferentes tipos de células, este gen de referencia también se encuentra sobreexpresado en el suero de pacientes con cáncer mamario del subtipo RE+ y RE- (Hitesh, 2011).

Por lo anterior, decidimos emplear como control endógeno SNORD44 el cual se ha empleado en análisis de expresión de miRNAs en células y tejidos de cáncer. En un reporte donde se evaluaron RNU6, Rna5S, SNORD24 y SNORD44 en estudios de expresión en cáncer de colon se encontró que este último mostró alta estabilidad entre las líneas celulares de cáncer de colon y sus contrapartes normales (Morata-Tarifa, 2017). Sanders y colaboradores realizaron estudios de expresión de miR-39 en muestras de suero de pacientes con cáncer de próstata, vejiga, y renal, y encontraron que SNORD44 es el gen más estable para normalizar (Sanders et al, 2018). En nuestro trabajo, este gen presentó una expresión estable en el panel completo de líneas celulares, cumpliendo las características de un buen gen endógeno por lo que se seleccionó como normalizador de nuestro análisis de expresión, nuestro gen seleccionado difiere con el empleado en los trabajos de Shen y Peng (RNU6), el perfil de expresión reportado en el presente trabajo coincide con lo publicado por Peng y Shen, en el cual ambos subtipos moleculares se encuentran significativamente sobreexpresados respecto al control y donde MCF-7 (+) presenta mayores niveles de expresión que MDA-MB-231 (RE-), los resultados difieren

por otro lado con el perfil reportado por Zhou, donde ambas líneas celulares se encuentran expresadas a la baja.

Como se mencionó con anterioridad, además del gen normalizador, la línea celular elegida como control normal también puede ser una variable importante para considerar en estudios de expresión de miRNAs. Shen y colaboradores emplearon la línea CCD-1095Sk que pertenece a fibroblastos de una paciente con cáncer de mama, mientras que la línea MCF-10A empleada en nuestro análisis y en el estudio de Peng *et al* corresponde a células epiteliales de mama no tumorigénicas. De acuerdo con un estudio de perfil de expresión de líneas celulares de mama, MCF-10A presenta una baja correlación de expresión de genes relacionados con los perfiles de líneas tumorigénicas (Ross y Perou, 2015). También es el modelo normal más comúnmente utilizado, sus características moleculares conocidas incluyen el locus cromosómico que contiene los genes p16 y p14ARF, ambos críticos en la regulación de la senescencia, y la amplificación del gen Myc (Soule et al, 1990), este perfil molecular así como su dependencia en factores de crecimiento y hormonas para su proliferación es similar al exhibido por células epiteliales normales, similitudes que la han convertido en el modelo ideal para el estudio del efecto de diversos oncogenes (Debnat *et al*, 2002), por otro lado, los fibroblastos como parte del estroma de células epiteliales de mama no presentan las mismas ventajas (Sadlonova *et al*, 2005)

Nuestros antecedentes directos no reportan el número de pase empleado en ambas líneas celulares, en la presente investigación se utilizaron células con pases menores a 10 debido a que diversos estudios reportan cambios en el fenotipo y genotipo de las células conforme aumenta el número de pases, esto se debe a diversos factores de estrés en el ambiente de cultivo, este fenómeno se observa particularmente en líneas celulares inmortalizadas (Quintero-Ronderos, 2013).

En este trabajo también determinamos el efecto del miR-660 sobre la proliferación de líneas celulares de cáncer de mama, donde observamos una disminución significativa de la proliferación de las células MCF-7 y MDA-MB-231 al tratarlas con el inhibidor del miR-660.

En los ensayos de proliferación de las células MCF-7 (RE+) y MDA-MB-231 (RE-) transfectadas con un inhibidor del miR-660 observamos una disminución de la viabilidad celular a las 24, 48 y 72 horas después de la transfección en el caso del subtipo RE-, y a las a las 48 y 72 horas en la línea celular RE+. Se evaluó la confluencia celular en los tiempos establecidos y se observó que eran consistentes con los análisis estadísticos, es decir se mostró una disminución de la confluencia en los pozos transfectados con inhibidor. Nuestro antecedente directo Shen *et al* reporta una disminución de la proliferación en células MCF-7 (RE+) a partir de las 48 horas de incubación después de la transfección con el inhibidor del miR-660, este efecto se vuelve más marcado a las 72 horas cuando se observa una disminución de la viabilidad celular de aproximadamente 50% en comparación con las células no tratadas y su respectivo control negativo (Shen et al, 2017). En la misma línea celular Peng y colaboradores reportan una disminución de la viabilidad celular a las 24 h, sin embargo, esta no es significativa, por otro lado, a los tiempos de 48 y 72 h observan una disminución significativa (Peng *et al*, 2020). En nuestro estudio el porcentaje de inhibición celular en MCF-7 a 24 horas no es estadísticamente significativo, sin embargo, a las 48 y 72 h se observó una disminución significativa de la viabilidad, lo cual es consistente con lo reportado por Peng.

Otro aspecto a considerar es que para todos nuestros ensayos de proliferación se empleó una concentración del inhibidor de 50 nM, según estudios, una concentración más alta a 50 nM puede ser tóxicas para las células, esta concentración es también ampliamente utilizada en ensayos de inhibición (Stenvang, *et al*, 2012), sin embargo, Shen y Peng no reportan este importante dato.

Por otra parte, en la línea MDA-MB-231 a 24, 48 y 72 h de incubación después de la transfección observamos una disminución de la viabilidad celular en los pozos tratados con el inhibidor, de acuerdo con el análisis estadístico los porcentajes de inhibición con respecto a los controles presentan la misma tendencia que lo reportado por Peng *et al*, en donde los tres tiempos presentan una disminución significativa de la viabilidad celular. Shen *et al* no reporta los efectos de la sobreexpresión de miR-660 en células RE- ya que su estudio se enfocó en las células MCF-7 (RE+).

En conclusión, nuestra investigación muestra que el miR-660 se encuentra significativamente sobreexpresado en las células de cáncer de mama RE+ (MCF-7) y RE- (MDA-MB-231), además demuestra que el miR-660 juega un papel muy importante en la proliferación de ambas líneas de cáncer mamario al inducir dicho proceso. Al formar parte de un proyecto más amplio y completo, nuestros resultados permitirán identificar nuevos blancos específicos del miR-660 asociados a la proliferación del cáncer mamario RE+ y RE- y determinar el mecanismo por el cual este miRNA y sus blancos inducen la progresión de este tipo de cáncer, para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas basadas en la modulación de la expresión del miR-660, ampliando lo ya reportado hasta el momento sobre la función de este miRNA en cáncer de mama RE+ y RE-.

10. CONCLUSIONES

Existe una sobreexpresión del miR-660 en las células MCF- 7 (RE+) y MDA-MB-231 (RE-).

Existe una mayor sobreexpresión de miR-660 en las células del subtipo RE+ en comparación con las del subtipo RE-.

La sobreexpresión del miR-660 induce la proliferación en células de cáncer de mama de los subtipos RE+ y RE-

11. PERSPECTIVAS

Llevar a cabo ensayos de funcionalidad como migración, invasión y angiogénesis, para determinar el efecto del miR-660 en la progresión del cáncer de mama RE+ y RE-.

Identificar nuevos blancos directos del miR-660 a través de los cuales induce la progresión del cáncer de mama RE+ y RE-.

Identificar las vías de señalización del miR-660 a través de las cuales este miRNA y sus blancos directos inducen la progresión del cáncer de mama RE+ y RE-.

REFERENCIAS

- Amir merghou, Mansoureh Akouchekian *Therapeutic impacts of microRNAs in breast cancer by their roles in regulating processes involved in this disease*. Res Med Sci. 2017; 22: 130.
- Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 116, 281-297.
- Benz F, Roderburg C, Vargas Cardenas D, Vucur M, Gautheron J, Koch A, et al. *U6 is unsuitable for normalization of serum mirna levels in patients with sepsis or liver fibrosis*. Experimental & molecular medicine. 2013.
- Blenkiron C, Goldstein LD, Thorne NP, Spiteri I, Chin SF, Dunning MJ, Barbosa-Morais NL, Teschendorff AE, Green AR, Ellis IO et al (2007) *MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype*. Genome Biol 8(10):R214
- Borchert GM, Lanier W, Davidson BL (2006) *RNA polymerase III transcribes human microRNAs*. Nat Struct Mol Biol 13(12):1097–1101.
- Borzi C, Calzolari L, Centonze G, Milione M, Sozzi G, Fortunato O. *mir-660-p53-mir-486 network: a new key regulatory pathway in lung tumorigenesis*. Int J Mol Sci. 2017;18(1).
- Costa I., (2014) *Caracterización Y Validación Morfológica y Molecular de Los Tumores Mamarios Experimentales. Modulación Por Los Lípidos de La Dieta*. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad De Medicina. Departamento de Biología Celular, de Fisiología y de Inmunología.
- Debnath J, Mills KR, Collins NL, Reginato MJ, Muthuswamy SK, Brugge JS. *The role of apoptosis increating and maintaining luminal space within normal and oncogene-expressing mammary acini*. Cell.2002; 111(1):29–40. Epub 2002/10/10.
- DeSantis, C. E., Bray, F., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., Anderson, B. O., & Jemal, A. (2015). International Variation in Female Breast Cancer Incidence and Mortality

Rates. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 24(10), 1495–1506.

Di Leva G, Garofalo M, Croce CM. *MicroRNAs in cancer*. *Annu Rev Pathol*. 2014;9:287–314.

Eliyatkin, Nuket & Yalçın, Evrim & Zengel, Baha & Aktas, Safiye & Vardar, Enver. (2015). *Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way*. *Journal of Breast Health*. 11. 59-66.

Frontela (2012). *MicroRNAs in cancer - from research to the clinical practice*. *Revista cubana de medicina*, 51-63.

Guerrero-Zotano A, Mayer IA, Arteaga CL. *PI3K/AKT/mTOR: role in breast cancer progression, drug resistance, and treatment*. *Cancer Metastasis Rev* 2016; 35: 515–524.

Hanahan D, Weinberg RA (2011) *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*, 144(5) 646–74.

Heneghan HM, Miller N, Lowery AJ, Sweeney KJ, Newell J, Kerin MJ (2010) *Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer*. *Ann Surg* 251(3):499–505.

Ibarra R. (2014) *Valor del Tercer Nivel Ganglionar, en la Disección Axilar, en el Cáncer de mama* Universidad Autònoma de Barcelona. U.A.B. Barcelona, España. 2014.

Imigo et al (2011). *Clasificación molecular del cáncer de mama*. *Cuad. Cir*. 25:67-74.

INEGI (2018). *Estadísticas día mundial contra el cáncer*. Comunicado de prensa.

Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Ménard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M, Croce CM. *MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer*. *Cancer Res*. 2005 Aug 15; 65(16):7065-70.

Jian-Jun Zhao, Peng-Jie Chen , Rui-Qin Duan ,Ke-Ji Li, Yu-Zhong Wang , Yong Li (2017). *miR-630 functions as a tumor oncogene in renal cell carcinoma*. Basic Research.

Jones R, Watson K, Bruce A, Nersesian S, Kitz J, Moorehead (2017) *Re-expression of miR-200c suppresses proliferation,colony formation and in vivo tumor growth of murine claudinlow mammary tumor cells*. Oncotarget 8(14).

Krishnan P, Ghosh S, Wang B, Li D, et al. (2015) *Next generation sequencing profiling identifies miR-574-3p and miR- 660-5p as potential novel prognostic markers for breast cancer*. BMC Genomics 16: 735.

Lan H, Lu H, Wang X, Jin H. (2015) *MicroRNAs as Potential Biomarkers in Cancer: Opportunities and Challenges*. BioMed Research International ;2015:125094.

Li B, Lu Y, Wang H, Han X, Mao J, Li J, Yu L, Wang B, Fan S, Yu X et al 2016. *miR-221/222 enhance the tumorigenicity of human breast cancer stem cells via modulation of PTEN/Akt pathway*. Biomed Pharmacother 79:93–101

Li Y, Liang C, Ma H, Zhao Q, Lu Y, Xiang Z, Li L, Qin J, Chen Y, Cho WC et al (2014) *miR-221/222 promotes S-phase entry and cellular migration in control of basal-like breast cancer*. Molecules 19(6):7122–7137

Liang Z, Wu H, Reddy S, Zhu A, Wang S, Blevins D, Yoon Y, Zhang Y, Shim H (2007) *Blockade of invasion and metastasis of breast cancer cells via targeting CXCR4 with an artificial microRNA*. Biochem Biophys Res Commun 363(3):542–546.

Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR (2005). *MicroRNA expression profiles classify human cancers*. 435(7043):834-8.

Mandujano-Tinoco, E. A., García-Venzor, A., Melendez-Zajgla, J., & Maldonado, V. (2018). *New emerging roles of microRNAs in breast cancer*. *Breast Cancer Research and Treatment*, 171(2).

Mattick JS, Gagen MJ (2001). *The evolution of controlled multitasked gene networks: The role of introns and other noncoding RNAs in the development of complex organisms*. *Mol Biol Evol*. 18:1611–1630.

Mertens-Talcott SU, Chintharlapalli S, Li X, Safe S (2007) *The oncogenic microRNA-27a targets genes that regulate specificity protein transcription factors and the G2-M checkpoint in MDAMB-231 breast cancer cells*. *Cancer Res* 67(22):11001–11011.

Pan Y, Li J, Zhang Y, Wang N, Liang H, Liu Y, Zhang CY, Zen K, Gu H (2016) *Slug-upregulated miR-221 promotes breast cancer progression through suppressing E-cadherin expression*. *Sci Rep* 6:25798.

Peng Zhang Haifeng Gao Qing Li Xinlei Chen Xifa Wu (2018). *Downregulation of microRNA-660 inhibits cell proliferation and invasion in osteosarcoma by directly targeting forkhead box O1*. *Molecular Medicine Reports*.

Peng, B., Li, C., He, L., Tian, M., & Li, X. (2020). *miR-660-5p promotes breast cancer progression through down-regulating TET2 and activating PI3K/AKT/mTOR signaling*. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 53(12), e9740.

Reynoso-Noverón N, Villaseñor-Navarro Y, Hernández-Ávila M, Mohar-Betancourt A. (2015) *Carcinoma in situ e infiltrante identificado por tamizaje mamográfico oportunista en mujeres asintomáticas de la Ciudad de México*. *Salud Publica*

Sadlonova, A., Novak, Z., Johnson, M. R., Bowe, D. B., Gault, S. R., Page, G. P., Thottassery, J. V., Welch, D. R., & Frost, A. R. (2005). *Breast fibroblasts modulate epithelial cell proliferation in three-dimensional in vitro co-culture*. *Breast cancer research : BCR*, 7(1), R46–R59. <https://doi.org/10.1186/bcr949>

Salati S, Salvestrini V, Carretta C, Genovese E, Rontauroli S, Zini R, Rossi C, Ruberti S, Bianchi E, Barbieri G, Curti A, Castagnetti F, Gugliotta G, Rosti G, Bergamaschi M, Tafuri A, Tagliafico E, Lemoli R, Manfredini R. *Deregulated expression of miR-29a-3p, miR-494-3p and miR-660-5p affects sensitivity to tyrosine kinase inhibitors in MCL leukemic stem cells* *Oncotarget*. 2017;8(30):49451-49469.

Sanders I, Holdenrieder S, Walgenbach-Brunagel G, von Ruecker A, Kristiansen G, Muller SC, Ellinger J. *Evaluation of reference genes for the analysis of serum mirna in patients with prostate cancer, bladder cancer and renal cell carcinoma.* International journal of urology: official journal of the Japanese Urological Association. 2012; 19:1017–25.

Shen Y, Ye YF, Ruan LW, Bao L, Wu MW, Zhou Y. (2017) *Inhibition of miR-660-5p expression suppresses tumor development and metastasis in human breast cancer.* Genet Mol Res. Feb 23;16(1)

Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2018) *Cancer statistics.* Cancer Journal for Clinicians Mar 8(1), 7–30.

J. Stenvang, A. Petri, M. Lindow, S. Obad, S. Kauppinen, (2012) *Inhibition of microRNA function by antimiR oligonucleotides,* Silence, 3 1.

Van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, Yudong DH, Hart AA, Mao M et al. *Gene exppresions profiling predicts clinical outcome of breast cancer.* Nature 2002; 415:530-36

Volker schirmacher. *From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment.* International journal of oncology nov 2019(54): 407-419

Weige Tan,, Bodu Liu , Shaohua Qu , Gehao Liang , Wei Luo, Chang Gong. *MicroRNAs and cancer: Key paradigms in molecular therapy.* Oncology Letters Feb 2017 (5): 2735-2742

Xu P, Wu Q, Yu J, Rao Y, Kou Z, Fang G, Shi X, Liu W and Han H (2020) *A Systematic Way to Infer the Regulation Relations of miRNAs on Target Genes and Critical miRNAs in Cancers.* Front. Genet.11:278.

Zhou H, Tang G, Zhao M, Xie L, Xie Y, Zhang Z, He X. *circFBXL5 promotes breast cancer progression by sponging miR-660.* J Cell Mol Med. 2020 Jan;24(1):356-361

Zhu S, Si ML, Wu H, Mo YY (2007) *MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1).* J Biol Chem 282(19):14328–14336

Zhu W, Qin W, Atasoy U, Sauter ER (2009) *Circulating microRNAs in breast cancer and healthy subjects*. BMC Res Notes 2:89